

1

明 細 書

プロテオグリカンのコアタンパク質からキシラナーゼを用いてグリコサミノグリカンを分離する方法

技術分野

本発明はプロテオグリカンのコアタンパク質と糖鎖グリコサミノグリカンとの結合部位を切断して、糖鎖グリコサミノグリカンを損傷することなく採取する方法に関する。

背景技術

複合糖質としてのプロテオグリカン分子1個は、分子量数万から数十万のコアタンパク質と呼ばれる骨格のタンパク質1本に、分子量数千から数十万の長大な糖鎖グリコサミノグリカン（以下G A G糖鎖という。）が数本から数十本結合している生体高分子である（第1図参照）。G A G糖鎖は、その糖鎖の基本構成により、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ケラタン硫酸など数種類に分けられるが、基本的にはいずれもアミノ糖とウロン酸の二糖繰り返し構造からなる長鎖のヘテロ酸性多糖であり、ヒアルロン酸以外のG A G糖鎖はコアタンパク質に結合してプロテオグリカンを形成している。

そして、プロテオグリカンは、コラーゲンやヒアルロン酸とともに、ほとんどすべての動物組織において、細胞と細胞の間にある細胞外マトリックスの重要な構成成分として普遍的に存在しており、動物組織構築の重要な役割を担っているほか、細胞を取りまく物理的環境をつくり、細胞の接着、増殖、分化といったさまざまな活動を制御している。

そのG A G糖鎖部分は、生物学的情報シグナル構造に依存した異なった機能も有している為、あるプロテオグリカンのコアタンパク質に、別のプロテ

2

オグリカンの G A G 糖鎖を結合できれば、本来の動物組織には存在しないプロテオグリカン、人工的に合成することが可能となり、全く新しい物質を生化学的に作り出すことができる。しかしその為には、動物組織から抽出したプロテオグリカンの G A G 糖鎖部分を、本来の機能を損なわないように分離する必要がある。

プロテオグリカンは、先に述べたように、コアタンパク質の Ser に G A G 糖鎖のキシロースが結合 (Xyl-Ser 結合) している巨大分子であり、従来、G A G 糖鎖の採取にはタンパク質分解酵素によってコアタンパク質を消化して糖鎖部分のみを採取する方法、或いは、本発明者らがすでに特許出願しているエンドー β -キシロシダーゼを用いて切断する方法が考えられていた。

しかし、タンパク質分解酵素を用いる方法では、G A G 糖鎖を完全な形で採取することはできない。また、エンドー β -キシロシダーゼを用いる方法では、この酵素自体が試薬として販売されておらず、プロテオグリカンを大量に処理することが出来ない為、一般的ではなかった。

発明の開示

ホタテ貝中腸腺由来のエンドー β -キシロシダーゼは、プロテオグリカンのコアタンパク質と G A G 糖鎖との結合部位である Xyl-Ser 結合を加水分解し、G A G 糖鎖を完全な形で切り離すことのできる酵素であるが、調製には多くの時間と費用を要し、ごく少量しか調製できないという欠点がある。そこで、安価で短時間で大量に調製することができる微生物由来のキシラナーゼに着目し、いくつかのキシラナーゼを用いてエンドー β -キシロシダーゼ活性のスクリーニングを行った。さらに、グリコサミノグリカンの切り出しを行う場合の至適条件を求め、本発明を完成した。

図面の簡単な説明

3

第1図は、細胞外マトリックスとプロテオグリカンの模式図を示す。

第2図は、5種類のキシラナーゼを用いて、エンドー β -キシロシダーゼ活性を比較したものである。

第3図は、MU-GAGに対するキシラナーゼの作用を調べるために、酵素反応生成物をHPLCにて解析したものである。

第4図は、MU-GAGを基質とした際の加水分解反応生成物の還元末端糖を分析したものである。

第5図は、Streptomyces olivaceoviridis 由来キシラナーゼの MU-GAG に対する特性を明らかにするため、加水分解の至適特性 pH を調べたものである。

第6図は、Streptomyces olivaceoviridis 由来キシラナーゼの MU-GAG に対する特性を明らかにするため、経時変化を調べたものである。

発明を実施するための最良の形態

本発明の実施の形態を具体的に説明する。

エンドー β -キシロシダーゼ活性のスクリーニングは 4-methylumbelliferone (MU) を還元末端側に有する MU-GAG を基質とし、反応後、遊離した MU を蛍光光度計で測定した。さらに、天然の基質として、サケ鼻軟骨由来のペプチドコンドロイチン硫酸 (peptide-ChS)、ブタ皮膚由来のデルマタン硫酸 (DS)、ウシ気肺由来のヘパラン硫酸 (HS) を用い、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で解析した。

本発明を完成させるために検討対象として選定したキシラナーゼは次の5種類である。

- (A) Aureobasidium pullulans 由来
- (B) Thermomyces lanuginosus 由来
- (C) Trichoderma viride 由来

(D) Streptomyces olivaceoviridis 由来

(E) Streptomyces lividans 由来

Thermomyces lanuginosus、Trichoderma viride 由来のキシラナーゼは Sigma 社 (St. Louis, MO, USA) から購入した。Streptomyces olivaceoviridis、Streptomyces lividans 由来のキシラナーゼは HiTrap chelating column アフィニティークロマトグラフィーを行った後、限外濾過にて濃縮、脱塩を行い、20mM リン酸ナトリウム緩衝液中で 4°C にて保存した。

エンドー β -キシロシダーゼ活性の人工基質である MU-GAG は培養ヒト皮膚繊維芽細胞から調整したものを用いた。MU-オリゴ糖は MU-GAG をヒアルロニダーゼで消化後、Bio-Gel P-4 カラムクロマトグラフィーで調製した。p-nitrophenyl Xyl-Xyl (PNP-X2) は、キシロビオース混合物 (サントリー) から精製したキシロビオースから合成した。アクチナーゼ E は科研製薬株式会社のものを用いた。

プロテオーコンドロイチン硫酸 (Proteo-Chs)、プロテオーデルマトン硫酸 (Proteo-DS)、プロテオーヘパラン硫酸 (Proteo-HS) は、各々サケ鼻軟骨、ブタ皮膚、ウシ肺から Heinegard と Hascall に従って精製した。Peptide-Chs, Peptide-DS, Peptide-HS を得るために、それらのプロテオグリカン を 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0、10 mM CaCl_2 中で、50°C、24 時間アクチナーゼ消化した後、Sephacryl S-200HR カラムで精製した。

次に測定方法及び測定装置を示す。

(2-アミノピリジンでの蛍光標識)

オリゴ糖還元末端の蛍光 (PA) 標識は Hase et al. の方法に従い行った。

(エンドー β -キシロシダーゼ活性の評価)

エンドー β -キシロシダーゼ活性の測定は、以下のように行った。即ち、40 μM MU-GAG を基質として、0.1 M sodium phosphate buffer, 酵素溶液を含む 50 μl の反応液を 37°C で 10 分間インキュベートした。0.5 M glycine-NaOH

buffer, pH 10.4 を 1 ml 加えて反応を停止し、遊離した MU の蛍光を蛍光光度計（型番 Hitachi F-4500, 日立製作所製）にて励起波長(ex.)350 nm、測定波長(em.)450 nm で測定した。活性の値は、一定のキシラナーゼ活性（以下の条件で測定し、基質である PNP-X2 を同量加水分解するときの酵素量）を示す酵素量を用いた際の相対的な活性値で表している。キシラナーゼ活性の測定は次のように行った。0.8 mM PNP-X2 を基質として、0.1 M sodium phosphate buffer, 酵素溶液を含む 50 μ l の反応液を 37°C で 10 分間インキュベートした。0.02 M NaOH を 1 ml 加えて反応を停止し、遊離した PNP 吸光度を波長 405 nm で測定した。

（高速液体クロマトグラフィー）

以下に述べる高速液体クロマトグラフィーはすべて蛍光指示計(型番 F-1150, 日立製作所製)を装備した HPLC(型番 Hitachi L-6200, 日立製作所製)を用いた。

（MU オリゴ糖及び MU）

MU オリゴ糖と MU の分析は Ultrasphere ODS カラム（4.6 mm×25 cm）、溶媒は 0～50 分間で 0～30% のアセトニトリルを用いた。流速 1.0 ml/分、検出は ex.325 nm, em.380 nm の蛍光を測定した。

（還元末端糖）

PA 化還元末端糖の分析は Ultrasphere ODS カラム（4.6 mm×25 cm）、溶媒は 0.25 M クエン酸ナトリウム、1% アセトニトリルを用いた。流速 0.5 ml/分、ex.320nm, em.400nm 分、ex.320nm, em.400nm で蛍光を測定した。PA-glucose, PA-galactose, PA-xylose をスタンダードとして用いた。

（PA 化 GAGs）

PA 化 GAGs 分析は TSKgel DEAE-5PW カラム(7.5 mm×75 mm)、溶媒は NaCl を用い、0～1M の直線的濃度勾配で溶質した。流速 1.0 ml/分、検出は ex.325 nm, em.380 nm の蛍光を測定した。

実施例

(キシラナーゼにおけるエンドー β -キシロシダーゼ活性のスクリーニング)

市販の Aureobasidium pullulans (A)、Thermomyces lanuginosus (B)、Trichoderma viride (C) 由来のキシラナーゼ、調製した Streptomyces olivaceoviridis (D)、Streptomyces lividans (E) 由来の 5 種類のキシラナーゼを用いて、エンドー β -キシロシダーゼ活性を比較した (第 2 図)。各値は、一定のキシラナーゼ活性を示す酵素量を用いた際の相対的な活性値で表している。その結果、Aureobasidium pullulans 以外の 4 種のキシラナーゼにエンドー β -キシロシダーゼ活性が検出された。これらのうち活性が高かったのは、Streptomyces olivaceoviridis 由来のキシラナーゼであったため、本酵素に着目して、実際に Xyl-Ser 結合を加水分解していることを証明するために次の実験を行った。

(Streptomyces olivaceoviridis 由来のキシラナーゼの MU-GAG に対する作用)

MU-GAG に対するキシラナーゼの作用を調べるために、酵素反応生成物を HPLC にて解析した (第 3 図)。第 3 図において、A は MU-GAG 酵素消化前、B は MU-GAG 酵素消化後を示し、矢印はスタンダードの MU 溶出位置を示している。MU-GAG のピークは、キシラナーゼによる酵素消化後に消失し、溶出時間 33 分に新たなピークが見られ、これはスタンダードの MU の溶出位置と一致した。

次に MU-GAG を基質とした際の加水分解反応生成物の還元末端糖を分析した。即ち、加水分解反応生成物を PA 化して、終濃度 2 M の塩酸で 100°C、2 時間で加水分解後、HPLC にて単糖分析を行った (第 4 図)。図の矢印はそれぞれ、1 は PA-glucose、2 は PA-galactose、3 は PA-xylose のスタンダードの溶出位置を示している。その結果、スタンダードの PA-xylose と同じ溶出

位置にピークが検出された。以上の結果から、本酵素は MU-GAG のキシロシド結合 (MU- β -Xyl) をエンド型で加水分解する、エンド- β -キシロシダーゼ活性を持つことが明らかとなった。

(Streptomyces olivaceoviridis 由来キシラナーゼのエンド- β -キシロシダーゼ活性における特性)

本酵素の MU-GAG に対する特性を明らかにするため、加水分解の至適特性 pH (第 5 図)、経時変化 (第 6 図) を調べた。第 5 図において、pH 2 は 0.1 M glycine-HCl buffer、pH 3-6 は 0.1 M citrate buffer、pH 7-8 は 0.1 M Tris-HCl buffer、pH 9-12 は 0.1 M glycine-NaOH buffer を使用した。MU-GAG を基質としたときの加水分解の至適 pH は 6.0 であり、本酵素のキシラナーゼ活性の至適 pH 5.7 とほぼ一致した。また、第 6 図の経時変化に示したように、本測定条件下では反応 30 分でエンド- β -キシロシダーゼ活性が一定になることが明らかになった。

(Streptomyces olivaceoviridis 由来キシラナーゼにおける GAG 構成要素による活性への影響)

Proteo-ChS, Proteo-DS, Proteo-HS は異なる繰返し二糖を持っているが、コアタンパク質との結合部位は、GlcA-Gal-Gal-Xyl-Ser という共通構造である。そこで、GAG 構成要素の違いによる加水分解活性への影響を調べた。Proteo-ChS, Proteo-DS, Proteo-HS を精製した酵素とともに 37°C、pH 6.0、24 時間インキュベートした。生成物のオリゴ糖還元末端を PA 化した後 HPLC にて解析し、そのピーク面積から加水分解活性を算出して相対的に表した(表 1)。

表 1

GAG 構成要素の活性に対する影響	
	相対活性
Peptide-ChS	1 0 0
Peptide-DS	1 0 8
Peptide-HS	1 4 5

Peptide-ChS を加水分解する際の活性を 1 0 0 として相対的な値であらわしている。

これらの結果から、精製した酵素は、Peptide-ChS, Peptide-DS, Peptide-HS を加水分解することが明らかになり、いずれのプロテオグリカンの分解にも有効であることが判明した。

産業上の利用可能性

本発明を利用して GAG 糖鎖を全く無傷に切り出し、それをタンパク質に導入することができれば、これまで合成することのできなかつた新規のプロテオグリカンの作成が可能となる。

従って、遺伝子工学的には糖鎖の欠損や不完全な糖鎖の結合のため、その生理活性の発現やタンパク質の安定性に問題のあったリコンビナントタンパク質も、この手法を用いることによって解決策が見いだされる可能性がある。

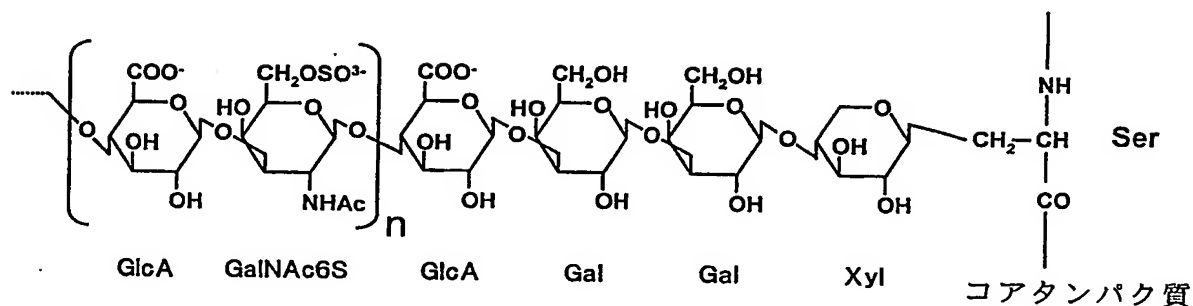
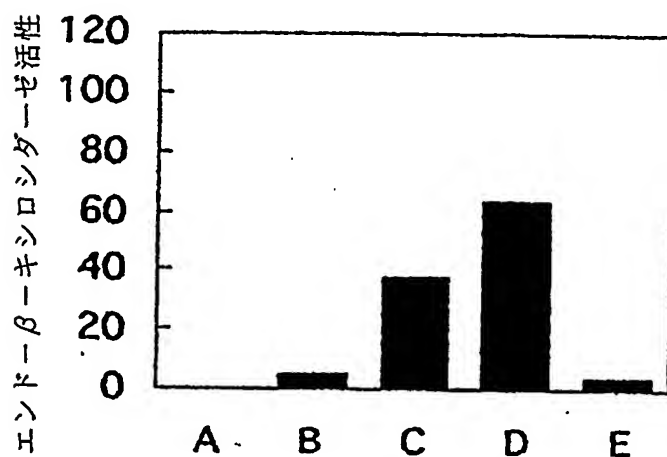
本発明は、人工的にプロテオグリカン进行合成できるため、遺伝子工学と組み合わせることによって、新薬の開発への道が拓かれることが期待される。

請求の範囲

1. プロテオグリカンのコアタンパク質から糖鎖グリコサミノグリカンを分離するために、キシラナーゼを用いることを特徴とする糖鎖グリコサミノグリカンの分離方法。

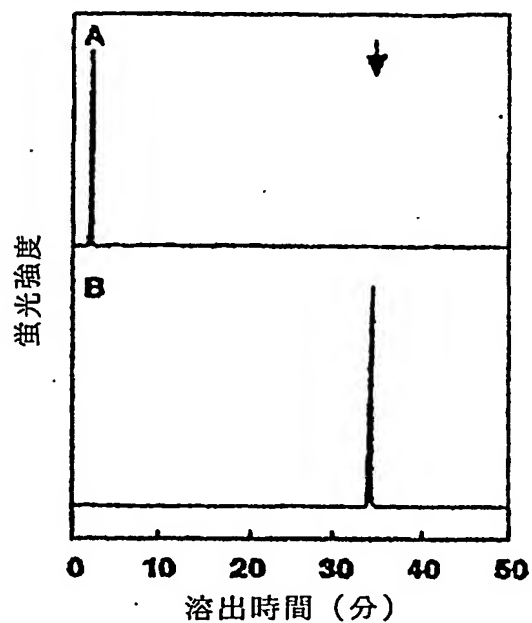
2. 請求項1記載の糖鎖グリコサミノグリカンの分離方法において、キシラナーゼが Streptomyces olivaceoviridis 由来のキシラナーゼである糖鎖グリコサミノグリカンの分離方法。

第1図 細胞外マトリックスとプロテオグリカンの模式図

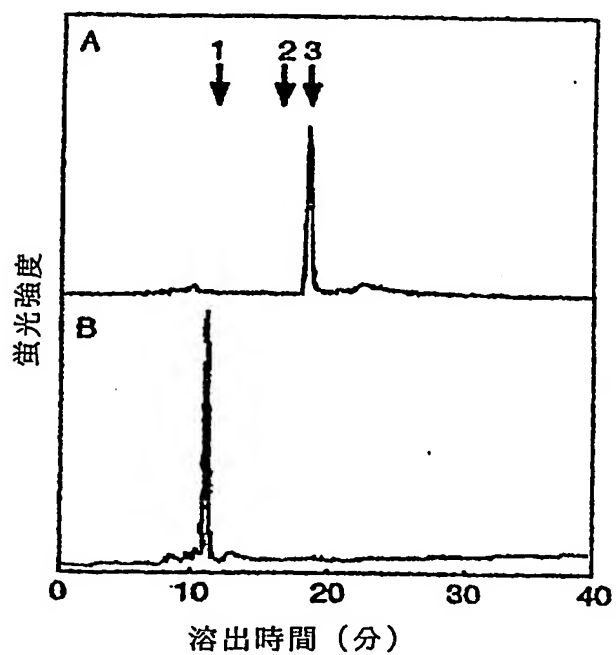
第2図 各種キシラナーゼのエンド- β -キシロシダーゼ活性の比較

2 / 3

第 3 図 *S.olivaceoviridis* 由来のキシラナーゼによる
MU-GAG 加水分解前後の HPLC

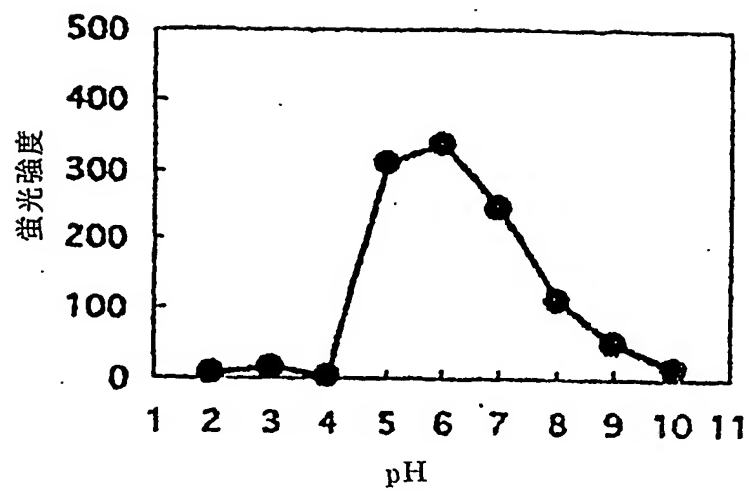


第 4 図 加水分解反応生成物の還元末端糖分析

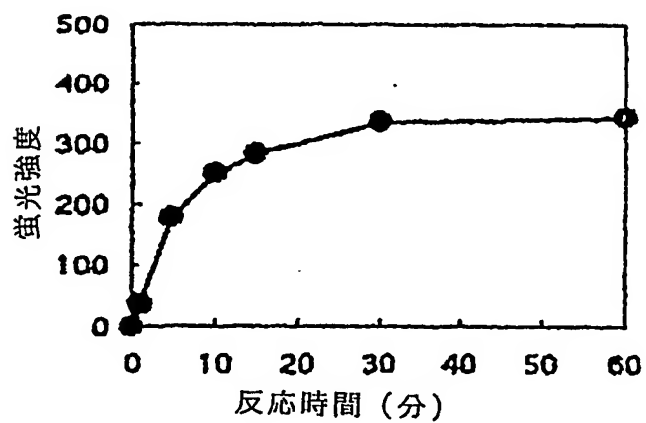


3/3

第5図 pH 活性曲線



第6図 経時変化



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/15091

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12P19/26

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12P1/00-C12P41/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus (JOIS), CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Keiichi TAKAGI et al., Isolation and Characterization of Patinopecten Mid-gut Gland Endo- β -xylosidase Active on Peptidochondroitin Sulfate., J.Biol.Chem., 1990, Vol.265, No.2, pages 854 to 860	1-2
P,A	WO 2003/099856 A1 (Kakuhiko Corp.), 02 December, 2003 (02.12.03), Full text & JP 2003-339396 A	1-2

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
 05 February, 2004 (05.02.04)

Date of mailing of the international search report
 17 February, 2004 (17.02.04)

Name and mailing address of the ISA/
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int Cl⁷ C12P19/26

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int Cl⁷ C12P1/00-C12P41/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
JSTPlus (JOIS)
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Keiichi Takagi, et al., Isolation and Characterization of Patnopecten Mid-gut Gland Endo- β -xylosidase Active on Peptidochondroitin Sulfate. J. Biol. Chem., 1990, Vol.265, No.2, pp854-860	1-2
P, A	WO 2003/099856 A1 (株式会社角弘), 2003. 12. 02, 文献全体 &JP 2003-339396 A	1-2

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05. 02. 2004

国際調査報告の発送日

17. 2. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田中 耕一郎 印

4B

9636

電話番号 03-3581-1101 内線 3446